

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-354694

(43)Date of publication of application : 25.12.2001

(51)Int.Cl.

C07K 5/062

A61K 31/33

A61P 35/00

A61P 43/00

C07D273/00

C12N 9/99

(21)Application number : 2000-176346

(71)Applicant : YAMANOUCHI PHARMACEUT CO
LTD

(22)Date of filing : 13.06.2000

(72)Inventor : HAYATA KINYA
SEKI NORIO
SHINTO NOBUAKI
TERADA HIROSHI
MORI MASAMICHI
AMINO NOBUAKI
YOKOI TAKAKO
NAGAI KOJI

(54) DITHIOL DERIVATIVE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new compound useful as a medicine, especially as a histon-deacetylating enzyme(HDAC) inhibitor.

SOLUTION: This dithiol derivative or its pharmaceutically permissible salts has the HDAC-inhibiting activity and also a cytotoxic activity in human cancer cells, and therefore it is useful as a treating agent for diseases or illnesses associated with the acetylation of histon, especially as an antitumor agent.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-354694

(P2001-354694A)

(43) 公開日 平成13年12月25日 (2001. 12. 25)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 0 7 K 5/062		C 0 7 K 5/062	4 C 0 5 6
A 6 1 K 31/33		A 6 1 K 31/33	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
43/00	1 1 1	43/00	1 1 1
C 0 7 D 273/00		C 0 7 D 273/00	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-176346(P2000-176346)

(22) 出願日 平成12年6月13日 (2000. 6. 13)

(71) 出願人 000006677

山之内製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

(72) 発明者 早田 錦矢

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 関 規夫

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(74) 代理人 100089200

弁理士 長井 省三 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジチオール誘導体

(57) 【要約】

【課題】 医薬、殊にヒストン脱アセチル化酵素 (HDA C) 阻害剤として有用な新規化合物の提供。

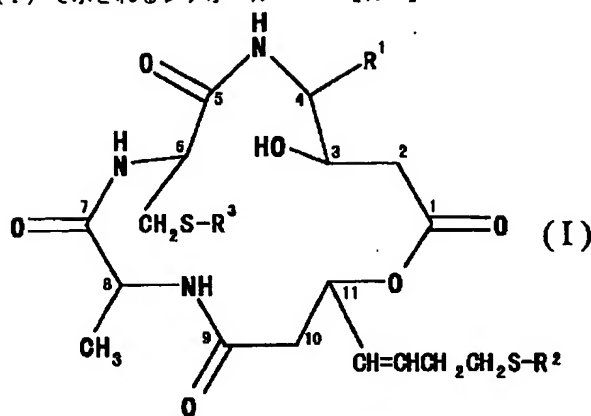
【解決手段】 本発明のジチオール誘導体またはその製薬学的に許容される塩は、HDAC阻害活性を有し、また、ヒト癌細胞において細胞障害活性を有することから、ヒストンのアセチル化の関与する疾患や病態の治療剤として、殊に抗腫瘍剤として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(I)で示されるジチオール

誘導体またはその製薬学的に許容される塩。

【化1】



(式中、R¹はイソプロピル基、sec-ブチル基またはイソブチル基を、R²及びR³は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基又は式-CO- (置換基を有していてもよい炭化水素基) を意味する。)

【請求項2】 請求項1記載のジチオール誘導体またはその製薬学的に許容される塩を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項3】 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である請求項2記載の医薬組成物。

【請求項4】 抗腫瘍剤である請求項2記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】 本発明は医薬、殊にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、及び抗腫瘍剤として有用な新規なジチオール誘導体またはその製薬学的に許容される塩、及び該化合物を有効成分として含有する医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 細胞の核内のDNAはヌクレオソームを基本としたクロマチン構造を形成している。ヌクレオソームはコアヒストン(ヒストンH2A、H2B、H3、H4それぞれ2分子ずつから成る8量体)とDNAとが巻き付いた構造体で、ヒストンN末端に存在する正電荷を帯びたリジン残基は負電荷を帯びたDNAと電荷的に安定な状態を形成することでヌクレオソームは高次に折り畳まれた状態で存在している(Wolffe, A.P. et al Cell 84, 817-819, 1996)。核内で遺伝子の転写反応が起こるためにはその構造を解けた状態にして、様々な転写因子がDNAに接触できるようにすることが必要である。転写が抑制されている遺伝子領域のヒストンはアセチル化の程度が低く、活発に転写が起こっている遺伝子領域のヒストンはアセチル化の程度が高いといったように、ヒストンのアセチル化と転写活性化の関連性が以前より知られていた(Hebbes, T.R. et al EMBO J. 7, 1395-1402, 1988, Grunstein,

n, M. et al Nature 389, 349-352, 1997)。ヌクレオソーム中のヒストンのリジン残基がアセチル化されるとその正電荷は中和され、ヌクレオソーム構造が弛緩することで様々な転写因子がDNAに接触できるようになり、転写が起こりやすくなると考えられている(Hong, L. et al J. Biol. Chem. 268, 305-314, 1993)。

【0003】 ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル化酵素(ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(Histone Acetyltransferase): HAT)とヒストン脱アセチル化酵素(ヒストンデアセチラーゼ(Histone Deacetylase): HDAC)とのバランスによって制御されていることが知られており、近年、いくつかのHAT並びにHDACが同定されその転写調節における重要性が報告されている(Ogryzk o, V.V. et al Cell 87, 953-959, 1996, Brown, C.E. et al Trends Biochem. Sci. 25(1), 15-19, 2000, Grozin ger, C.M. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4868-4873, 1999)。

【0004】 一方で、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導など多彩な作用を有する酪酸は、細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、HDAC阻害作用を有することが以前より知られていた(Counsens, L. S. et al J. Biol. Chem. 254, 1716-1723, 1979)。また、微生物代謝産物のトリコスタチンA(TSA)は細胞周期の停止、分化誘導を示し(Yoshida, M. et al Cancer Res 47, 3688-3691, 1987, Yoshida, M. et al Exp. Cell Res 177, 122-131, 1988)、またアポトーシスを誘導することが見出された。TSAは細胞内に高アセチル化ヒストンを蓄積させ、部分精製したHDACを用いた検討からTSAが強力なHDAC阻害剤であることが明らかとなった(Yoshida, M. et al J. Biol. Chem. 265, 17174-17179, 1990)。

【0005】 他のHDAC阻害剤についても研究が進んでいる。微生物代謝産物であるトラポキシシン(TPX)は細胞増殖を抑制し、v-sis形質転換細胞の形態を正常化する作用が知られていたが(Itazaki, H. et al J. antibiotics 43(12), 1524-1534, 1990)、後にHDAC阻害剤であるこ

とが明らかとなった (Kijima, M. et al J. Biol. Chem. 268, 22429-22435, 1993)。その阻害形式は不可逆的であることからこのTPXを分子プローブとしてこれに結合するヒトHDACのクローニングも報告されている (Tauntou, J. et al Science 272 408-411, 1996)。その他、Depudecin (Kwon, H. J. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3356-3361, 1998)、フェニル酪酸 (Warrell, R. P. Jr. et al J. Natl. Cancer Inst. 90(21), 1621-1625, 1998)、FR-901228 (Nakajima, H. et al Exp. Cell Res. 241, 126-133, 1998)、MS-27-275 (Saito, A. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-4597, 1999)などの化合物がHDAC阻害作用を有することが報告されている。

【0006】HDAC阻害剤は、細胞周期停止、形質転換細胞の形態正常化、分化誘導、アポトーシス誘導作用などを有することから、抗腫瘍剤としての効果が期待されている。また、細胞増殖性疾患の治療・改善薬として、例えば感染症、自己免疫疾患、皮膚病 (Darkin-Rattray, S. J. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13143-13147, 1996)などの治療・改善薬、さらに遺伝子治療におけるベクター導入の効率化 (Dion, L. D. et al Virology 231, 201-209, 1997)、導入遺伝子の発現亢進 (Chen, W. Y. et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5798-5803, 1997)など様々な応用も試みられており、有用な医薬となることが期待されている。既知のHDAC阻害剤のいくつかは医薬として開発が進められているが、今なお、活性

強度、安定性、体内動態や毒性などの更に改善された薬剤の創製が切望されている。

【0007】

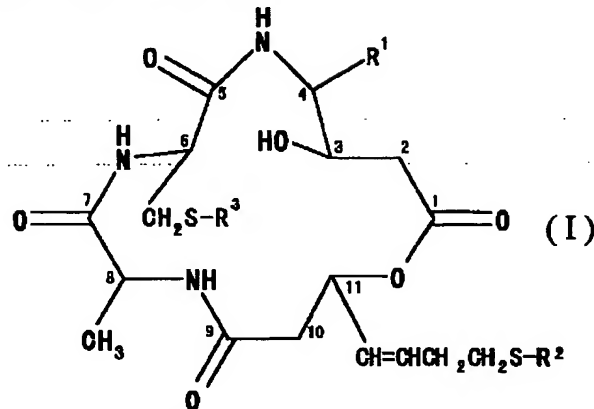
【発明を解決しようとする課題】本発明は、HDACの関与する疾患、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の予防若しくは治療剤として有用な新規化合物の提供を目的とするものである。

【0008】

【課題を解決する方法】本発明者等は、天然に存在する多くの微生物が産生する化合物につき、鋭意検討した結果、シュードモナス属に属する新種の微生物を見だし、該培養物から優れたヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性及びTGF- β 様作用を有する新規なデブシペプチド化合物を単離し、先に特許出願を行った (PCT/JP00/00110)。更にこれらの化合物の新規な誘導体を合成し、その薬理作用を検討した結果、これらの化合物が優れたHDAC阻害作用を有し、またヒト癌細胞に対する良好な細胞障害活性を有することを知見し、本発明を完成した。

【0009】即ち、本発明は、下記一般式 (I) で示される新規なジチオール誘導体またはその製薬学的に許容される塩、並びに当該化合物を有効成分として含有する医薬組成物、殊にHDAC阻害剤並びに抗腫瘍剤に関する。

【化2】



(式中、R¹はイソプロピル基、sec-ブチル基またはイソブチル基を、R²及びR³は、同一又は異なって、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基又は式-CO- (置換基を有していてもよい炭化水素基) を意味する。以下同様。)

【0010】以下、本発明を更に詳細に説明する。前記一般式 (I) に関して、置換基を有していてもよい炭化水素基としては、例えば脂肪族炭化水素、シクロアルキル、アリール、アラルキル基等が挙げられ、脂肪族炭化水素基としては、好ましくは直鎖若しくは分枝状のC1-8アルキル、C2-8アルケニル若しくはC2-8アルキニル基が挙げられ、より好ましくはC6以下、更に好ましくはC4以下の脂肪族炭化水素基であり、特に好ましくは、メチ

ル、エチル、ビニル、プロピル、プロペニル、イソプロピル、t-ブチル基である。該脂肪族炭化水素基は1以上の置換基で置換されていてもよく、置換基としては、該脂肪族炭化水素基の置換基として許容される置換基であれば特に制限は無いが、好ましくは、ハロゲン (F, Cl, Br, I)、ニトロ、シアノ、置換されていてもよいアミノ基 (メチルアミノ、エチルアミノ、ジメチルアミノ基等) が挙げられる。シクロアルキル基としては、C3-8のシクロアルキルが好ましい。アリール基としては、好ましくはC14以下のアリールであり、より好ましくはフェニル若しくはナフチル基である。アラルキル基としては、-C1-4アルキル-フェニルが好ましく、より好ましくはベンジル若しくはフェネチル基である。こ

これらのシクロアルキル、アリール及びアラルキル基は任意の位置で1以上の置換基を有していてもよく、その置換基としては、これらの置換基として許容される置換基であれば特に制限は無いが、好ましくは、ハロゲン

(F, Cl, Br, I)、ニトロ、シアノ、置換されていてもよいアミノ、C1-6アルキル、C2-6アルケニル基等が挙げられる。

【0011】本発明のジチオール誘導体の製薬学的に許容される塩としては、無機若しくは有機塩基との塩であり、具体的にはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アルミニウムなど無機塩基、メチルアミン、エチルアミン、エタノールアミンなどの有機塩基、リジン、オルニチンなどの塩基性アミノ酸との塩等を挙げることができる。また、本発明化合物は不斉炭素原子及び二重結合を有するので、これに基づく立体異性体(ラセミ体、光学異性体、ジアステレオマー等)及び幾何異性体(シス体又はトランス体)が存在する。従って本発明化合物は、これらの立体異性体又は幾何異性体の混合物もしくは単離されたものを包含する。さらに、本発明は、当該化合物の水和物または各種溶媒和物や、当該化合物の結晶多型も包含する。

【0012】(本発明化合物の製造方法)本発明のジチオール誘導体またはその製薬学的に許容される塩は、シュードモナス属(Pseudomonas)に属する微生物の培養物から得られたジスルフィド構造を有するデブシペプチド化合物を、常法の還元反応に付すことによって製造することができる。更に、所望により当業者に公知のエーテル化或いはアシル化反応に付して、チオール基の末端が修飾されたジチオール誘導体を得ることができる。

【0013】ジスルフィドの還元反応としては、例えば、i)亜鉛、スズ等の金属と原料化合物を反応させることによって、ii)水素化アルミニウムリチウム、水素化アルミニウムナトリウム、水素化ホウ素ナトリウム等の金属水素錯化合物と原料化合物を反応することによって、iii)硫化ナトリウム、硫化カリウム、硫化水素と原料化合物を反応することによって、iv)メルカプトエタノール、ジチオトレイトール等のチオール類と原料化合物を反応させることによって、或いは、v)トリフェニルホスフィン、トリブチルホスフィン等のリン化合物と原料化合物を反応させることによって行うことができる。反応は、冷却下〜加温下に実施できるが、ジスルフィドの還元反応の条件は、本発明化合物の二重結合やラク톤を還元しない範囲で適宜設定されるべきである。用いられる溶媒としては、例えば、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジエチルエーテル等のエーテル類、塩化メチレン、クロロホルム等のハロゲン炭化水素類、ジメチルスルホキシド、N,N-ジメチルホルムアミドの他、メタノール、エタノール等のアルコール類、またはこれらの混合物、或いは所望により含水溶媒が挙げられる。反応を促進させる

上で、酸、例えば塩酸、酢酸等を加えることが好ましい場合がある。

【0014】上記の還元反応によって得られたジチオール化合物のアルキル化あるいはアシル化は、常法により行うことができ、例えば日本化学会編「実験化学講座」(丸善)、グリーン(Greene)及びウッツ(Wuts)著、「Protective Groups in Organic Synthesis」第2版に記載されている方法を用いることができる。好ましくは、アルキル化は、例えば、トリエチルアミン、炭酸カリウム、水素化ナトリウムなどの塩基存在下、ヨウ化メチル、臭化ベンジル等のアルキル化試薬を反応させることにより、また、アシル化は、無水酢酸、ピバル酸無水物などの酸無水物もしくは塩基存在下でハロゲン化アシルと反応させることにより行うことができる。反応は、N,N-ジメチルホルムアミド、アセトニトリル、トルエン、塩化メチレン等の反応に関与しない溶媒中、冷却下乃至加熱下に行うことができるが、反応の条件は、本発明化合物の他の構造部分と反応しない範囲で適宜設定されるべきである。以上のようにして得られた本発明のジチオール誘導体は所望により常法の造塩反応に付して製薬学的に許容される塩として得ることもできる。

【0015】(原料化合物の製造方法)本発明化合物の原料化合物であるデブシペプチド化合物は、微生物を培養することによって得られる。培養は一般微生物の培養方法に準じて行われる。本発明化合物の原料化合物の製造方法において使用する微生物は、シュードモナス属に属し当該化合物の生産能を有する微生物であればいずれも用いることができる。このような微生物としては、例えば、長野県北佐久郡望月町で採集された土壌より分離されたシュードモナス属に属する細菌シュードモナス・エスピー(Pseudomonas sp.) Q71576株(工業技術院生命工学工業研究所 受託番号FERM BP-6944号)を挙げることができる。本菌株の菌学的性状は特許出願(PC/T/JP00/00110)に記載の通りである。

【0016】培養に用いられる培地としては、シュードモナス・エスピー Q71576株が利用する栄養源を含有する培地であればよく、合成培地、半合成培地または天然培地が用いられる。培地に添加する栄養物として公知のものを使用できる。培地の組成は、例えば炭素源としてはD-グルコース、D-マンノース、D-フルクトース、イノシトール、D-マンニトール、D-ガラクトース、トレハロース、キサンチン、デンプン、ブドウ糖、デキストリン、グリセリン、植物油等が挙げられる。窒素源としては肉エキス、ペプトン、グルテンミール、綿実粕、大豆粉、落花生粉、魚粉、コーンステープリカー、乾燥酵母、酵母エキス、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿酸その他の有機、無機の窒素源が用いられる。また、金属塩としては、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、鉄、コバルトなどの硫酸塩、硝酸塩、炭酸

塩、リン酸塩などが必要に応じて添加される。さらに、必要に応じてメチオニン、システイン、シスチン、チオ硫酸塩、オレイン酸メチル、ラード油、シリコン油、界面活性剤などの生成促進化合物または消泡剤を添加することもできる。

【0017】培養条件としては好氣的条件下で培養するのが一般的に有利で、培養温度は3～32℃（上記生理学的性質の記載参照）の範囲、好ましくは20～25℃付近で行われる。培地のpHは約5～9、好ましくは約5～7.5の範囲に調整すると好結果が得られる。培養期間は培地の組成、温度条件に応じて適宜設定されるが、通常1～7日程度、好ましくは2～4日程度である。培養物より目的とする本発明原料化合物を単離するには、微生物が産生する代謝産物に用いる通常の抽出、精製の手段が適宜利用できる。例えば培養化合物中の該化合物は培養液をそのままか、又は遠心分離あるいは培養物に濾過助剤を加えて濾過して得られた培養液に酢酸エチル等の水と混和しない有機溶剤を加えて抽出する。また、培養液を適宜の担体に接触させ、濾液中の生産化合物を吸着させ、次いで適当な溶媒で溶出することにより該化合物を抽出することができる。例えば、アンバーライトXAD-2、ダイヤイオンHP-20、ダイヤイオンCHP-20、又はダイヤイオンSP-900のような多孔性吸着樹脂に接触させて該化合物を吸着させる。次いでメタノール、エタノール、アセトン、ブタノール、アセトニトリル又はクロロホルム等の有機溶媒を単独若しくは混合した溶媒を、又は当該溶媒と水の混合液を用いて該化合物を溶出させる。このときの有機溶媒の混合比率を低濃度より段階的に又は連続的に高濃度まで上げていくことにより、該化合物の含まれる比率のより高い画分を得ることができる。酢酸エチル、クロロホルム等の有機溶媒で抽出する場合には、培養濾液にこれらの溶媒を加え、良く振盪し、該化合物を抽出する。次に、上記の各操作法を用いて得た該化合物含有画分は、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフィー、遠心液々分配クロマトグラフィー、ODSを用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等の定法により、さらに純粋に分離精製することができる。一方、TGF- β 様作用等の原料化合物の性質を指標として、適当な溶剤に対する溶解性及び溶解度の差等を利用する一般の生理活性化合物の製造に用いられる手段によって、分離、精製することもできる。これらの方法は必要に応じて単独に用いられ、又は任意の順序に組合せ、反復して適用できる。

【0018】

【発明の効果】一般式（I）に示される本発明化合物は、後記試験例に示すように、HDAC阻害作用を有し、またヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を示すことが確認された。従って、一般式（I）で示される本発明のジチオール誘導体またはその製薬学的に許容される塩は、

ヒストンのアセチル化の関与する疾患や病態、殊に腫瘍や細胞増殖性疾患の治療及び改善に有用である。ここに、細胞増殖性疾患としては、例えば、感染症、自己免疫疾患、皮膚病が挙げられる。特に本発明化合物は良好なヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制活性を有することから、抗腫瘍剤（例えば大腸癌、肺癌、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、脳腫瘍及び白血病等に対する薬剤等）として有用である。更に、本発明化合物は遺伝子治療におけるベクター導入の効率化や導入遺伝子の発現亢進にも有用である。

【0019】本発明化合物の有用性は以下の試験により確認されたものである。

試験例1：HDAC阻害試験

（1） $[^3\text{H}]$ アセチルヒストンの調整

ヒト白血病細胞K562細胞（ 1.3×10^9 個）を2時間10mM酢酸ナトリウム存在下で $[^3\text{H}]$ 酢酸ナトリウム（第一化学薬品株式会社；NET-003H）標識し、吉田らの方法（Yoshida, M. et al J. Biol. Chem 265, 17174-17179, 1990）に従ってヒストン抽出を行った。抽出ヒストンは水で溶解し、ブラッドフォード法で蛋白質定量を行った（7 mg/ml）。

【0020】（2）HDACの部分精製

K562細胞より単離した核を吉田らの方法（Yoshida, M. et al J. Biol. Chem 265, 17174-17179, 1990）に従って抽出し、その抽出液をQ Sepharose FFカラム（ファルマシア社；17-0510-01）を用い、0-0.5MのNaClの濃度勾配によりHDACの部分精製を行った。その後、HDA緩衝液[15mMリン酸カリウム（pH7.5）、5%グリセロール、0.2mM EDTA]で透析を行った。

（3）HDAC阻害活性の測定

（1）で調整した $[^3\text{H}]$ アセチルヒストンをHDA緩衝液で280 $\mu\text{g/ml}$ に希釈しこれを25 μl と、（2）で精製・透析したHDAC画分25 μl とを混合し室温にて4時間反応させた後、1M塩酸を50 μl 添加して反応を停止させ、さらに酢酸エチル800 μl を加え混合・遠心を行い、酢酸エチル層400 μl をシンチレーターバイアルに採取し、5 mlのシンチレーターを添加して遊離した $[^3\text{H}]$ 酢酸の放射活性を液体シンチレーションカウンタにて測定した。基質と酵素とを混合する前に予めDMSOで溶解・希釈した薬物を2 μl 添加し、上記のアッセイを行うことで薬物のHDACに対する阻害活性を検討した。本発明の実施例1の化合物（1）は良好なHDAC阻害活性を示した。

【0021】試験例2：ヒト癌細胞に対する細胞増殖抑制試験

96穴テストプレート中に、 6×10^4 個/mlに調製したヒト大腸癌WiDr細胞、 4×10^4 個/mlに調製したヒト非小細胞肺癌NCI-H358細胞、 1×10^5 個/mlに調製したヒト乳癌MDA-MB-231細胞、 4×10^4 個/mlに調製したヒト腎癌A-498細胞、 5×10^4 個/mlに調製したヒト白血病K-562細胞、 1×10^4 個/mlに調製したヒト脳腫瘍U373-MG細胞、又は4

×10⁴個/mlに調製したヒト肺癌MIA-PaCa-2細胞をCO₂インキュベーター中で37℃で培養した。24時間後、種々の濃度の本発明の実施例1の化合物(1)を100 μl加え、CO₂インキュベーター中で37℃でさらに72時間培養した。培養後、スルフォローダミンBで細胞数を定量し、細胞増殖に対する抑制率を算出した。その結果、実施例1の化合物(1)はWiDr細胞、NCI-H358細胞、MDA-MB-231細胞、A-498細胞、K-562細胞、U373-MG細胞又はMIA-PaCa-2細胞に対し、良好な細胞増殖抑制活性を示した。

【0022】以下に本発明化合物を有効成分として含む医薬組成物の製造方法及び使用方法を詳述する。本発明のジチオール誘導体又はその製薬学的に許容される塩の1種又は2種以上を有効成分として含有する医薬組成物は、通常用いられている製剤用の担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、液剤、注射剤、坐剤、軟膏、貼付剤等に調製され、経口的又は非経口的に投与される。本発明化合物のヒトに対する臨床投与量は、通常経口投与の場合、1日の投与量は、体表面積当たり約1から10000 mg/m²、好ましくは10～5000 mg/m²が適当であり、これを1回であるいは2乃至4回に分けて投与する。静脈投与される場合は、1日の投与量は、体表面積当たり約0.1から10000 mg/m²が適当で、1日1回乃至複数回に分けて投与する。投与量は症状、年齢、性別等を考慮して個々の場合に依りて適宜決定される。

【0023】本発明による経口投与のための固体組成物としては、錠剤、散剤、顆粒剤等が用いられる。このような固体組成物においては、一つ又はそれ以上の活性化合物が、少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムと混合される。組成物は、常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えばステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤や繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、ラクトースのような安定化剤、溶解補助剤を含有してもよい。錠剤又は丸剤は必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣または胃溶性あるいは腸溶性化合物のフィルムで被膜してもよい。経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エチルアルコールを含む。この組成物は不活性な希釈剤以外に溶解補助剤、湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤を含有してもよい。

【0024】非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を包含す

る。水性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えば注射剤用蒸留水及び生理食塩水が含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としては、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エチルアルコールのようなアルコール類、ポリソルベート80(商品名)等がある。このような組成物は、さらに等張化剤、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤(例えば、ラクトース)、溶解補助剤のような添加剤を含んでもよい。これらは例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合又は照射によって無菌化される。これらはまた、無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水又は無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

【0025】本発明化合物の溶解性が低い場合には、可溶化処理を施してもよい。可溶化処理としては、医薬製剤に適用できる公知の方法、例えば界面活性剤(ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油類、ポリオキシエチレンソルビタン高級脂肪酸エステル類、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレングリコール類、ショ糖脂肪酸エステル類等)を添加する方法、薬物と可溶化剤例えば高分子

(ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ポリエチレングリコール(PEG)等の水溶性高分子、カルボキシメチルエチルセルロース(CMEC)、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート(HPMCP)、メタアクリル酸メチル-メタアクリル酸共重合体(オイドラギットL、S、商品名:ローム・アンド・ハース社製)等の腸溶性高分子)との固体分散体を形成する方法が挙げられる。更に必要により、可溶性の塩にする方法、サイクロデキストリン等を用いて包接化合物を形成させる方法等も採用できる。可溶化の手段は、目的とする薬物に応じて適宜変更できる[「最近の製剤技術とその応用1」、内海勇ら、医薬ジャーナル157-159(1983)及び「薬学モノグラフNo. 1、生物学的利用能」、永井恒司ら、ソフトサイエンス社、78-82(1988)参照]。

【0026】

【実施例】以下、実施例にて本発明化合物の具体的な製造方法を、また、参考例にて原料化合物の製造方法を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

参考例1

グルコース10g、ポテトスターチ20g、ポリペプトン5g、酵母エキス5g、炭酸カルシウム4g、蒸留水1Lを含む培地(pH7.0)100mLを、500mL容の三角フラスコに分注し、120℃で20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュードモナス エスピー-Q71576株を掻き取って接種し、28℃、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、種培養液とした。次にグリセロール30g、グルコース1g、

ポリペプトン5 g、肉エキス5 g、塩化ナトリウム5 g、消泡剤(NKL5430)0.5 g、蒸留水1 Lを含む培地(pH7.0)を100 mLずつ500 mL容の三角フラスコに分注し、120°Cで20分間滅菌した。この培地に前記種培養液を2 mLずつ接種し、28°C、200回転/分の条件で3日間、振盪培養した。

【0027】このようにして培養した培養液2.5 Lについて、6000 rpmで10分間遠心分離を行った。上清液を酢酸エチルにて抽出し、硫酸ナトリウムを添加して脱水した後、減圧下で濃縮乾固した。油状の粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(30 i.d.×200 mm)に供し、クロロホルム-メタノール(20:

1)で洗浄後、クロロホルム-メタノール(5:1)で溶出し、活性画分を濃縮した。次に、セファデックスLH-20カラムクロマトグラフィー(20 i.d.×500 mm)に供し、クロロホルム-メタノール(1:1)でゲル濾過を行った。活性画分を濃縮後、CPC (centrifugal partition chromatography)に供し、クロロホルム-メタノール-水(5:6:4)の溶媒系にて上昇法を用いて不純物を除去した。最終的に活性画分を濃縮乾固した後、メタノールに溶解し、センシュー科学社製 PEGASIL ODSカラム(20 i.d.×250 mm)を用い、35%アセトニトリル水溶液にて逆相HPLC(流速10 mL/分)を行った。その結果、化合物Aは10.8分に、化合物Bは15.4分にピークが認められ、それぞれのピークを分取することにより化合物A及びBの白色粉末を各10 mg得た。

【0028】参考例2

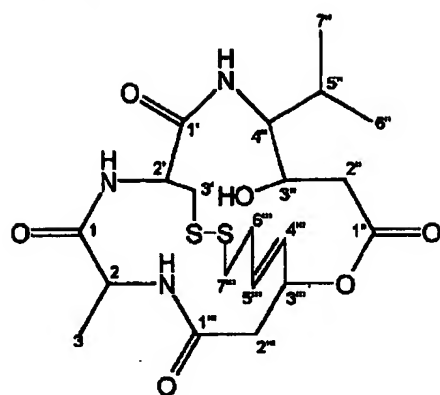
グルコース10 g、ポテトスターチ20 g、ポリペプトン5 g、酵母エキス5 g、炭酸カルシウム4 g、蒸留水1 Lを含

む培地(pH7.0)を100 mLずつ500 mL容の付き三角フラスコに分注し、120°Cで20分間滅菌した。ベネット寒天培地に良く生育させたシュドモナス エスピー Q71576株を掻き取って接種し、28°C、200回転/分の条件で3日間振盪培養した。同培地400 mLを2 L容の三角フラスコに分注し、120°Cで20分間滅菌した後、前記培養液8 mLを植菌し、28°C、200回転/分の条件で3日間振盪培養し、種培養液とした。次に水道水1 Lにつき、マンニトール30 g、ポリペプトン5 g、肉エキス5 g及び塩化ナトリウム5 gを含む培地(pH7.0)を、18 Lずつ30 L容ジャーファーメンター3基に分注し、120°Cで20分間滅菌した。この培地に前記種培養液を360 mLずつ接種し、24°C、150回転/分、1vvmで64時間培養を行った。シャープレスにて菌体と分離した培養液50 LをHP-20を充填したカラムに供し、水、20%アセトン水溶液、40%メタノール水溶液で洗浄後、80%アセトン水溶液で溶出した。溶出画分を濃縮して得られた水溶液についてクロロホルム、酢酸エチルで抽出を行い、各抽出物を混合して濃縮後、シリカゲルを充填したカラムに供した。クロロホルム-メタノール(50:1)、(20:1)、(10:1)で溶出し、クロロホルム-メタノール(20:1)および(10:1)溶出画分の一部を混合して濃縮後、エタノールに溶解して再結晶を行い、化合物A、B及びCを含む混合物として、白色粉末776 mgを得た。得られた粉末について、ODS-HPLCカラム(cosmosil AR-II 20 i.d.×250 mm)による化合物C溶出画分の分取を行い、化合物Cの白色粉末として20 mgを得た。上記の参考例で得られた化合物A、B及びCの化学構造式と物理化学的性状を以下に示す。

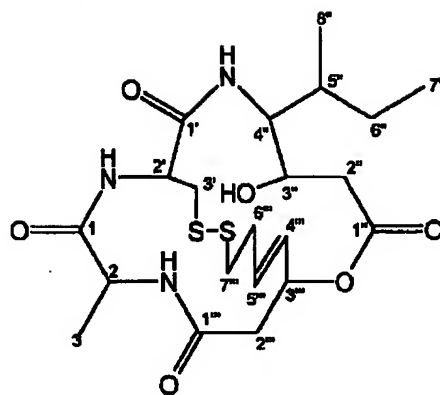
【0029】

【化3】

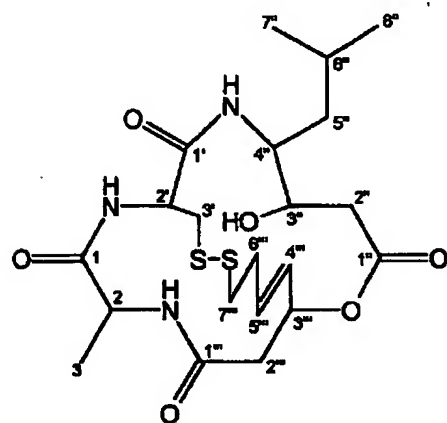
化合物A



化合物B



化合物C



【表1】

	化合物A	化合物B	化合物C
色及び形状	白色粉末	白色粉末	白色粉末
融点	135-138℃	132-135℃	N.T.
比旋光度 [α] _D ²⁵	-63.6° (c 0.14, MeOH)	-58.6° (c 0.11, MeOH)	-60.0° (c 0.10, MeOH)
分子式	C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₆ S ₂	C ₂₁ H ₃₃ N ₂ O ₆ S ₂	C ₂₁ H ₃₃ N ₂ O ₆ S ₂
高分解能FAB マススペクトラム			
Found	474.1735 (M+H) ⁺	488.1865 (M+H) ⁺	488.1889 (M+H) ⁺
Calcd	474.1733	488.1889	488.1889
紫外可視吸収 スペクトラム			
λ_{max}^{MeOH} nm (ϵ)	End absorption	End absorption	End absorption
赤外吸収 スペクトラム ν_{max} cm ⁻¹	(KBr法) 3400, 3350, 1720, 1660, 1520, 1260, 980	(KBr法) 3400, 3350, 1720, 1660, 1520, 1260, 980	(反射測定法) 3400, 3320, 1730, 1660, 1550, 1280, 980

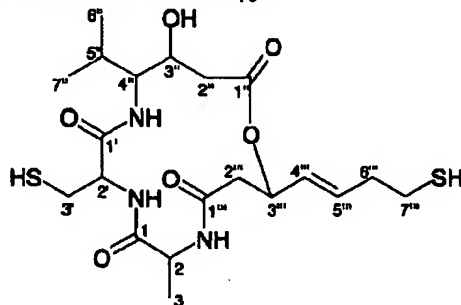
N.T. : 試験せず

【0030】実施例 1

化合物A 20 mgおよびトリフェニルホスフィン12 mgを4.5 mlのメタノールに溶解後、0.5 mlの水を加え、室温で一昼夜撹拌した。反応液を減圧下で濃縮後、少量のメタノールに溶解し、ODS-HPLCカラム (YMC Pro C18 20

i.d. × 250 mm, 40%アセトニトリル水溶液10 ml/minで溶出) にて分取を行い、下式で示される化合物 (1) 3.8 mgを得た。

【化4】



化合物 (1)

<物理化学的性状>

高分解能FABマススペクトラム (分子式C₂₀H₃₃N₃O
6S₂として)

Found : 476.1892 (M+H)⁺
Calcd : 476.1889

赤外吸収スペクトラム ν_{max} cm⁻¹ : 3300, 2560, 1730, 1660, 1540, 1260, 970

(反射測定法)

【0031】

【表2】

化合物(1)の¹Hおよび¹³C NMR 化学シフト値 (重クロロホルム中)

No.	δ _C	δ _H
1	173.0	
2	50.3	4.41 (qui, J = 6.7 Hz)
3	18.3	1.45 (d, J = 7.0 Hz)
NH		6.34 (d, J = 6.7 Hz)
1'	170.7	
2'	57.6	4.27 (m)
3'	25.1	2.86 (m), 3.45 (m)
NH		7.54 (d, J = 6.4 Hz)
SH		1.53 (dd, J = 7.6, 10.1 Hz)
1''	172.0	
2''	37.4	2.51 (m)
3''	68.0	4.47 (m)
4''	61.0	3.32 (m)
5''	29.1	2.05 (m)
6''	20.4	1.00 (m)
7''	19.4	0.95 (d, J = 6.7 Hz)
NH		7.25 (d, J = 7.3 Hz)
OH		3.46 (d, J = 8.8 Hz)
1'''	170.1	
2'''	41.3	2.58 (m)
3'''	71.2	5.66 (m)
4'''	128.8	5.53 (dd, J = 6.7, 15.2 Hz)
5'''	132.5	5.79 (dt, J = 7.0, 15.2 Hz)
6'''	36.2	2.36 (q, J = 7.0 Hz)
7'''	23.8	2.60 (m)
SH		1.40 (t, J = 7.7 Hz)

表中番号(No.)は前記の化学構造式中の炭素原子の位置を示す。

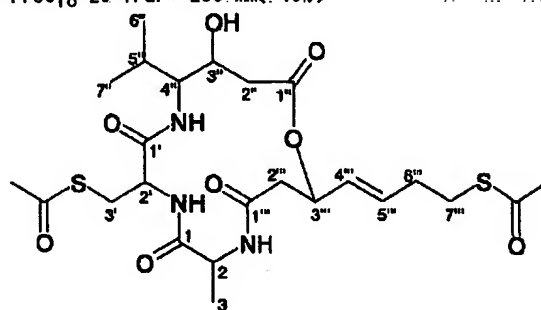
【0032】実施例2

前記実施例1で得られた化合物(1) 20 mgを塩化メレンに溶解し、無水酢酸40 mlを加え一昼夜攪拌した。反応液を減圧下で濃縮後、少量のメタノールに溶解し、ODS-HPLCカラム (YMC ProC18 20 i. d. × 250 mm, 40%ア

セトニトリル水溶液10 ml/minで溶出)にて分取を行い、下式で示される化合物(2) 4.8 mgを得た。

【0033】

【化5】



化合物(2)

<物理化学的性状>

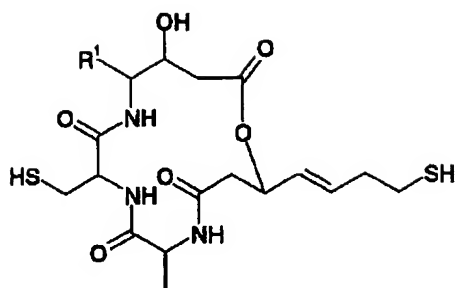
高分解能FABマスペクトラム (分子式C₂₄H₃₇N₃O8S₂として)Found : 560.2097 (M+H)⁺

Calcd : 560.2101

【0034】実施例3

前記原料化合物B若しくはCを、実施例1と同様に処理することによって、下式で示される化合物(3)若しくは(4)を得ることができる。

【化6】



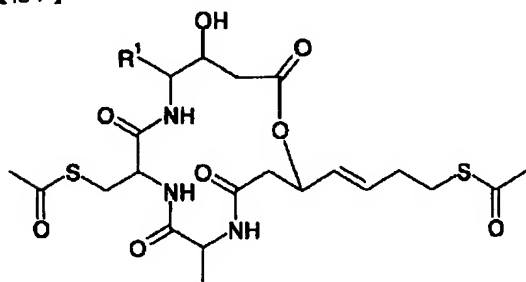
化合物(3) $R^1 = \text{sec-ブチル基}$

化合物(4) $R^1 = \text{イソブチル基}$

【0035】実施例4

化合物(3)若しくは(4)を、実施例2と同様に処理することによって、下式で示される化合物(5)若しくは(6)を得ることができる。

【化7】



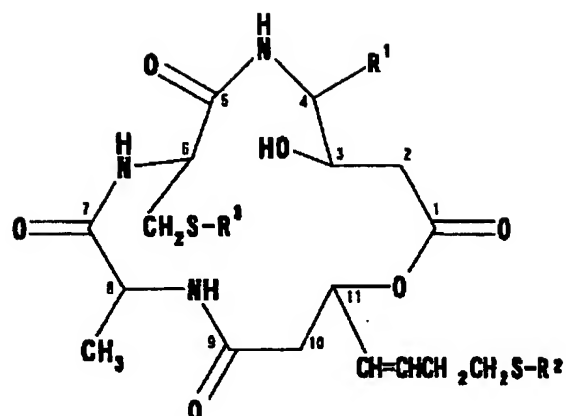
化合物(5) $R^1 = \text{sec-ブチル基}$

化合物(6) $R^1 = \text{イソブチル基}$

【0036】また、下表に化学構造式を掲記する化合物は、前記実施例若しくは製造法に記載の方法とほぼ同様にして、又は、それらに当業者に自明の若干の変法を適用して、前記原料化合物から容易に製造される。

【0037】

【表3】



化合物番号	R ¹	R ²	R ³
(7)	イソプロピル	メチル	メチル
(8)	sec-ブチル	メチル	メチル
(9)	イソブチル	メチル	メチル
(10)	イソプロピル	ビバロイル	ビバロイル
(11)	sec-ブチル	ビバロイル	ビバロイル
(12)	イソブチル	ビバロイル	ビバロイル

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

C12N 9/99

識別記号

F I

C12N 9/99

テ-マコード (参考)

(72) 発明者 新堂 信昭

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 寺田 央

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 森 政道

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 網野 伸明

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 横井 貴子

茨城県つくば市御幸が丘21 山之内製薬株式会社内

(72) 発明者 永井 浩二

東京都板橋区小豆沢1-1-8 山之内製薬株式会社内

F ターム (参考) 4C056 AA10 AB10 AC10 AD01 AE10

FA03 FA12 FB04 FB05

4C086 AA01 AA03 BC76 MA01 MA04

NA14 ZB26 ZC20

4H045 AA10 AA30 BA11 BA31 BA33

CA11 DA55 EA28 FA52 GA22

HA02

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.